

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-9279

(43) 公開日 平成11年(1999) 1月19日

(51) Int. CL ⁴	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
	1/21		1/21
	9/12		9/12
// C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:01)			

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-167265	(71) 出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22) 出願日	平成9年(1997) 6月24日	(72) 発明者	西矢 芳昭 福岡県教習市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社教習バイオ研究所内
		(72) 発明者	川村 良久 福岡県教習市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社教習バイオ研究所内
		(72) 発明者	芳本 忠 長崎県滑石2丁目29番10号

(54) 【発明の名称】 グリセロールキナーゼをコードする遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 高い安定性を有する新規なグリセロールキナーゼを遺伝子工学的に生産する方法を提供する。

【解決手段】 配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるサーマス・フラバスに由来するグリセロールキナーゼおよび該配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグリセロールキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該ベクターで形質転換した形質転換体および該形質転換体を培養し、グリセロールキナーゼを生成させ、該グリセロールキナーゼを採取することを特徴とするグリセロールキナーゼの製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の (a) または (b) のタンパク質であるグリセロールキナーゼをコードする遺伝子。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列 (a) において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロールキナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項2】 配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるグリセロールキナーゼをコードする遺伝子。

【請求項3】 以下の (c)、(d) 又は (e) の DNA からなるグリセロールキナーゼをコードする遺伝子。

(c) 配列表・配列番号2に記載される塩基配列からなる DNA

(d) 上記 (c) の塩基配列において、1もしくは複数の塩基が付加、欠失または置換されており、かつ、グリセロールキナーゼ活性を有するタンパク質をコードしている DNA

(e) 上記 (c) の塩基配列からなる DNA とストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ、グリセロールキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする細菌由来の DNA

【請求項4】 請求項1、2または3記載のグリセロールキナーゼをコードする遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項5】 請求項4記載の組換えベクターで宿主細胞を形質転換した形質転換体。

【請求項6】 請求項5記載の形質転換体を培養し、グリセロールキナーゼを生成させ、該グリセロールキナーゼを採取することを特徴とするグリセロールキナーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、新規なグリセロールキナーゼをコードする遺伝子ならびに遺伝子組換え技術による該酵素の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 グリセロールキナーゼ (EC 2.7.1.30) は、グリセロールをマグネシウムと ATP に依存したリン酸化反応によって、グリセロール-3-リン酸に変える反応を触媒する酵素である。このグリセロールキナーゼは、最初、1937年に、Kalickarによって、肝臓内に見つけられた (H. Kalickar, *Enzymologia*, 2, 47 (1937))。その後、ラット肝、ハト肝、キャンディグ・ミコデルマ (*Candida mycoderma*) などから精製され (C. Bublitza, *J. Biol. Chem.*, 211, 951 (1954); E. P. Kennedy, *Methods Enzymol.*, 5, 476 (1962); H. U. Bergmeyer, *Biochem.*, 333, 471 (1961))、また、ヒト、バチルス・ズプテリス

(*Bacillus subtilis*)、サッカロマイセル・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などから、その遺伝子のクローニングがなされている (C. A. Sargent, *Hum. Mol. Genet.*, 3, 1317 (1994); C. Holmberg, *J. Gen. Microbiol.*, 136, 2367 (1990); P. Pavlik, *Curr. Genet.*, 2, 4, 21 (1993))。特に、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) において、該酵素は詳しく研究がなされており、1967年に、Hayashi らによって精製され (S. Hayashi, *J. Biol. Chem.*, 242, 1030 (1967))、1988年にそのクローニングの報告がなされている (D. W. Pettigrew, *J. Biol. Chem.*, 263, 135 (1988))。また、遺伝子調節の研究、アロステリック阻害剤による阻害の研究など、広い範囲においても既に研究されている。

【0003】 これらの生理学的及び酵素化学的研究の他に、該酵素は臨床検査薬として、利用されている。すなわち、試料中の脂肪をリパーゼで加水分解し、生じたグリセロールを該酵素によってグリセロール-3-リン酸にし、さらに、グリセロール-3-リン酸性酵素とペルオキシダーゼをカップリングさせ、血中の脂質及びグリセロールの測定に利用されている。

【0004】 このように、臨床検査に利用されている酵素に求められる特性の1つに、高い安定性を持つことがあげられる。この高い安定性をもつ酵素を得るために、最近、好熱性細菌が注目されている。好熱性細菌は、180年に温泉で発見されて以来、その耐熱化機構が研究されてきたが、現在もはっきりとは、その機構が解明されていない。しかし、その菌の酵素は耐熱性であることが知られている。また、この酵素は高い熱安定性を持つだけではなく、他の化学変性剤に対しても抵抗性が高いことも知られている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 高い安定性をもつ新規なグリセロールキナーゼをコードする遺伝子の単離、ならびに遺伝子組換え技術による該酵素の製造法を確立し、該酵素の脂質及びグリセロールの定量への利用を可能とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記問題を解決するため、グリセロールキナーゼ生産菌として、サーマス・フラバス (*Thermus flavus*) T 4 3 2 0 (DSM 674) を選び、該菌体より抽出した染色体 DNA よりグリセロールキナーゼ遺伝子の単離に成功し、その DNA の全塩基配列を決定した。さらに、グリセロールキナーゼを遺伝子組換え技術によって形質転換体に高生産させることに成功し、高純度なグリセロールキナーゼを安価に大量供給することを可能にした。

【0007】 すなわち、本発明は以下の (a) または (b) のタンパク質であるグリセロールキナーゼをコードする遺伝子である。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列か

らなるタンパク質

(b) アミノ酸配列 (a) において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロールキナーゼ活性を有するタンパク質

【0008】また、本発明は以下の (c)、(d) 又は (e) のDNAからなるグリセロールキナーゼをコードする遺伝子である。

(c) 配列表・配列番号2に記載される塩基配列からなるDNA

(d) 上記 (c) の塩基配列において、1もしくは複数の塩基が付加、欠失または置換されており、かつ、グリセロールキナーゼ活性を有するタンパク質をコードしているDNA

(e) 上記 (c) の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、グリセロールキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする細菌由来のDNA

【0009】さらに、本発明は上記グリセロールキナーゼをコードする遺伝子を含有する組換えベクターである。

【0010】本発明は上記組換えベクターで宿主細胞を形質転換した形質転換体である。

【0011】また、本発明は上記形質転換体を培養し、グリセロールキナーゼを生成させ、該グリセロールキナーゼを採取することと特徴とするグリセロールキナーゼの製造法である。

【0012】

【発明の実施態様】本発明のグリセロールキナーゼをコードする遺伝子は、グリセロールキナーゼ生産微生物、例えばサーマス・フラバス (*Thermus flavus*) TE3420 (DSM674) などから抽出しても良く、または化学的に合成することである。

【0013】上記遺伝子としては、例えば (a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、または (b) アミノ酸配列 (a) において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロールキナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAがある。DNAの欠失、置換、付加の程度については、基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善するようにしたものを含む。これらの変異体を製造する方法は、従来から公知である方法に従う。

【0014】または、(c) 配列表・配列番号2に記載される塩基配列からなるDNA、(d) 上記 (c) の塩基配列において、1もしくは複数の塩基が付加、欠失または置換されており、かつ、グリセロールキナーゼ活性を有するタンパク質をコードしているDNAまたは

(e) 上記 (c) の塩基配列からなるDNAとストリン

ジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、グリセロールキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする細菌由来のDNAがある。ここで、ストリンジントな条件とは、 $\times 2SSC$ (300mM NaCl, 30mM クエン酸)、65℃、16時間である。

【0015】本発明のグリセロールキナーゼをコードする遺伝子を得る方法としては、例えばサーマス・フラバス (*Thermus flavus*) TE3420 (DSM674) の染色体DNAを分離、精製した後、超音波破砕、制限酵素処理等を用いて、DNAを断片化したものと、リナーゼ発現ベクターとを両DNAの平滑末端または接着末端においてDNAリガーゼなどにより結合閉鎖させて組換えベクターを構築する。こうして得られた組換えベクターは複製可能な宿主微生物に移入した後、グリセロールキナーゼ活性の発現を指標としてスクリーニングして、組換えベクターを保持する微生物を得る。次いで該微生物を培養し、該培養菌体から該組換えベクターを分離・精製し、該組換えベクターからグリセロールキナーゼ遺伝子を採取すれば良い。

【0016】遺伝子供与体であるサーマス・フラバス (*Thermus flavus*) TE3420 (DSM674) に由来するDNAは、具体的には以下のように採取される。すなわち、供与微生物を例えば、1〜3日間液体培養して得られた培養物を遠心分離にて集菌し、次いでこれを溶菌させることによりグリセロールキナーゼ遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌方法としては、例えばリゾチームや β -グルカナーゼ等の溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素やラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 等の界面活性剤が併用され、さらに凍結融解やフレンチプレス処理のような物理的破砕方法と組み合わせても良い。

【0017】このようにして得られた溶菌物からDNAを分離・精製するには常法、例えばフェノール処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理や、リボスクリュー処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

【0018】微生物から分離・精製されたDNAを切断する方法は、例えば超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができる。好ましくは特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素が適している。

【0019】ベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を宿主微生物とする場合には、ラムダPAPII (ストラジン製)、 λ gt \cdot 10、 λ gt \cdot 11などが使用できる。またプラスミドとしては、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を宿主微生物とする場合には、pBR322、pUC19、pBluescriptなどが使用できる。

5

【0020】このようなベクターを、上述したグリセロールキナーゼ遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素で切断してベクター断片を得ることができるが、必ずしも該微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同一の制限酵素を用いる必要はない。微生物DNA断片とベクターDNA断片とを結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であれば良く、例えば微生物DNA断片の接合末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの使用により微生物DNA断片とベクターDNA断片との組換えベクターを作成する。必要なら、アニーリングの後、宿主微生物に移入して生体内のDNAリガーゼを利用して組換えベクターを作成することもできる。

【0021】宿主微生物としては、組換えベクターが安定、かつ自律増殖可能で外來性遺伝子の形質発現できるものであれば良く、一般的にはエシェリヒア・コリW3110、エシェリヒア・コリC600、エシェリヒア・コリHB101、エシェリヒア・コリJM109などを用いることができる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合には、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などが用いることができる。

【0022】このようにして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量のグリセロールキナーゼを安定に生産し得る。宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカーとグリセロールキナーゼ活性を同時に発現する微生物を検索すれば良く、例えば薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、且つグリセロールキナーゼを生成する微生物を選択すれば良い。

【0023】上記の方法により得られたグリセロールキナーゼ遺伝子の塩基配列は、サイエンス(Science, 214, 1205-1210, 1981)に記載されたジデオキシ法により解読し、またグリセロールキナーゼのアミノ酸配列は、決定した塩基配列より推定した。このようにして一度選択されたグリセロールキナーゼ遺伝子を保有する組換えベクターは、形質転換微生物から取り出され、他の微生物に移入することも容易に実施することができる。また、グリセロールキナーゼ遺伝子を保有する組換えベクターから制限酵素やPCR法によりグリセロールキナーゼ遺伝子であるDNAを回収し、他のベクター断片と結合させ、宿主微生物に移入することも容易に実施できる。

【0024】形質転換体である宿主微生物の培養形態は、宿主の栄養生理学的性質を考慮して培養条件を選択*

作用：グリセロール + ATP \longleftrightarrow グリセロール-3-リン酸 + ADP

至適pH：約10.0 (Britton and Robinson buffer)

至適温度：約65℃ (pH 7.9)

pH安定性：約6.5 ~ 11.0 (37℃で6時間後も90%以上の残存活性を

6

*すべし良く、通常、多くの場合は液体培養で行うが、工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の炭素源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用される。宿主微生物が質化可能であれば良く、たとえばグルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜、ビルビン酸などが使用できる。窒素源としては、宿主微生物が利用可能な窒素化合物であれば良く、例えばペプトン、肉エキース、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物のような有機窒素化合物や、硫酸、塩安のよおする無機窒素化合物が使用できる。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用できる。

【0025】培養温度は宿主微生物が生育し、グリセロールキナーゼを生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリの場合、好ましくは20~42℃程度である。培養時間は培養条件により多少変動するが、グリセロールキナーゼが最高収量に達する時期を見計らって適当な時期に終了すれば良く、通常20~48時間程度である。培地pHは宿主微生物が生育し、グリセロールキナーゼを生産する範囲で適宜変更し得るが、通常好ましくはpH 6.0~9.0程度である。

【0026】培養液より菌体を回収する方法は、通常、用いられる方法により行えば良く、例えば遠心分離、濾過などにより回収することができる。培養液中のグリセロールキナーゼが菌体外に分泌される場合は、この菌体分離液を用いられ、下記の菌体破砕後の方法に準じてグリセロールキナーゼを分離・精製できる。グリセロールキナーゼが菌体内に存在する場合は、前述したような酵素的または物理的破砕方法により破砕抽出することができる。このようにして得られた粗酵素抽出液から例えば硫酸沈殿によりグリセロールキナーゼ画分を回収する。この粗酵素液を通常、用いる精製方法、例えば半透膜を用いた透析やセファデックスG-25 (ファルマシア バイオテック) ゲル過渡などにより脱塩を行うことができる。

【0027】この操作の後、例えばトヨバルH65C (東ソー) カラムクロマトグラフィー、DEAE-トヨバルH (東ソー) カラムクロマトグラフィーにより分離・精製し精製酵素標品を得ることができる。この精製酵素標品は電気泳動(SDS-PAGE)的にほぼ単一バンドを示す程度に純化されている。

【0028】本発明の製法により得られたグリセロールキナーゼ活性を有するタンパク質は、以下に示す理化学的性質を有する。

示す範囲)

熱安定性: 約65℃以下 (pH7.5で30分間後も90%以上の残存活性を

示す範囲)

等電点: 約4.3

分子量: 約58,000 (SDS-PAGE)

約220,000 (ゲル濾過)

K_m値: 約0.038mM (グリセロール)

約0.16mM (ATP)

約0.36mM (ジヒドロキシアセトン)

比活性: 50U/mg以上

【0029】本発明のグリセロールキナーゼと公知のグリセロールキナーゼとの性質の比較を表1に示す。本発明のグリセロールキナーゼは、同一反応を触媒する公知の酵素とは性質の異なる新規な酵素であり、特に公知の酵素よりも高い安定性を有する。

【0030】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。実施例中、グリセロールキナーゼの活性は、以下のようにして測定した。グリセロール、ジヒドロキシアセトン、ビルビン酸キナーゼ、乳酸脱水素酵素、NADH、フォスフォエノールビルビン酸は和光純薬工業、4-アミノアンチピリンはナカイイテスク、ATPはペーリンガーマンハイム社より購入した。その他の酵素は東洋紡績製のものを使用した。

【0031】<測定法1: グリセロール-3-リン酸を測定する方法>通常、この方法を用いて活性測定を行った。グリセロールを基質とし、グリセロール-3-リン酸の生成量によって酵素活性を測定した。0.5% 4-アミノアンチピリン水溶液0.2ml、1.5% フェノール水溶液0.2ml、グリセロール-3-リン酸酸化酵素200U、ペルオキシダーゼ80U、ATP48.4mgに0.1M HEPES緩衝液(pH7.9)を加え、総量21mlとし、これを以下の測定のための原液とした。各反応は、この測定原液を1.5ml取り、0.3Mグリセロール水溶液25μl、試料溶液50μlを添加し、混和後、37℃に制御された分光光度計で500nmの吸光度を3分間記録し、その初期直線部分から1分間当たりの吸光度変化を求めた(ΔOD/mi

n)。

【0032】<測定法2: ADPを測定する方法>酵素の基質特異性を見るために、この方法を用いた。グリセロールを基質とし、ADPの生成量によって酵素活性を測定した。フォスフォエノールビルビン酸4.33mg、NADH2.98mg、MgCl₂6H₂O42.7mg、ATP48.4mg、ビルビン酸キナーゼ80U、乳酸脱水素酵素80Uに、20mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を加え、総量21mlとし、これを以下の測定のための原液とした。各反応は、この測定原液を1.5ml取り、0.3Mグリセロール水溶液25μl、試料溶液50μlを添加し、混和後、25℃、

340nmの吸光度を3分間記録し、その初期直線部分から1分間当たりの吸光度変化を求めた(ΔOD/mi n)。酵素活性の定義は、上記各条件で1分間に1マイクロモルのグリセロールを分解する酵素量を1単位(U)とする。

【0033】実施例1 サーマス・フラバス (*Thermus flavus*) TE3420 (DSM674) からの染色体DNAの分離

サーマス・フラバス (*Thermus flavus*) TE3420 (DSM674) の染色体DNAを次の方法で分離した。酵母菌を400mlのポリバブトン-イーストエクストラクト培地で50℃一晩振とう培養した。6000rpm、10分間の遠心分離による集菌、洗浄後、10mlのNaCl-EDTA緩衝液に懸濁した。2.5mlのリゾチーム溶液(8mg/ml)を加え、37℃、20分間静置し、溶菌し始めた後、ドライアイスアセトンにて急冷した。その後、85mlのTris-SDS緩衝液と75mlのRNase A (10mg/ml)を加え攪拌した。懸濁液を60℃の水浴で加熱し、完全に溶解した。ライセイトをガラス遠心管中で等量のTris-HCl緩衝液(pH8.0)飽和フェノールと共に混和し、20分間ゆっくりと振り混ぜた。1500rpm、15分間の遠心分離によって2層に分離させ、上層を取り、2700rpm、30分間の遠心分離によって沈殿を除去し、染色体DNAを2倍量の冷エタノールと共にゆっくりと混和させることによって界面に沈殿させた。この糸状の沈殿をガラス棒で巻き取って集め、70、80または90%エタノールによって洗浄した。そのDNAを5mlの0.1×NaCl-クエン酸緩衝液(SSC)に溶解し、0.5mlの10×SSCを加えた。その溶液をTE緩衝液で4℃、3日間透析した。DNA濃度は、260nmの吸光度より計算した。

【0034】実施例2 ポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)

PCR用プライマーは、現在クローニングの報告がされているヒト、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、バチルス・ズブリリス (*Bacillus subtilis*) のグリセロールキナーゼの塩基配列を基にして作製した。配列表の配列番号3、配列表の配列番号4に記載される塩基配列はPCR用プライマーを示す。実施例1で得たDNA100ng、各プライマー200pmol、dN

9

TP 混合物 $10 \mu\text{l}$ 、反応緩衝液 $10 \mu\text{l}$ 、AmpliTaq DNAポリメラーゼ (ペーシンエルマー製) 2.5 U を混和し $100 \mu\text{l}$ とした。これを 94°C 、1 分間の変性反応、 45°C 、1 分間のアニーリング反応、および 72°C 、3 分間の伸長反応を 30 サイクル繰り返して PCR を行った。その結果、目的の大きさである約 300 bp のフラグメントが増幅された。この PCR 産物の塩基配列を決定し、エシェリヒ・コリ (*Escherichia coli*)、バチルス・ズブリリス (*Bacillus subtilis*) のグリセロールキナーゼの塩基配列と比較したところ、高い相同性を示したので、目的のグリセロールキナーゼ遺伝子の一部が増幅されたことが明らかとなった。

【0035】実施例 3 サザンハイブリダイゼーション
約 $2 \mu\text{g}$ の実施例 1 で得た DNA を種々の制限酵素で消化後、1% アガロースゲル電気泳動によって分離し、ニトロセルロースフィルターにトランスファーした。このフィルターを、実施例 2 で得た PCR 産物を³²P でラベル化したプローブと、 68°C 、20 時間ハイブリダイズさせた。その後、フィルターを 65°C 、1 時間 $6 \times \text{SSC} + 0.1\%$ SDS で洗浄し、X 線フィルムでオートラジオグラフィを行った。その結果、プローブは約 3.6 Kbp の HindIII 断片、約 1.0 Kbp の NotI 断片、約 0.6 Kbp の SalI 断片とそれぞれ強くハイブリダイズした。

【0036】実施例 4 グリセロールキナーゼをコードする遺伝子を含有する DNA の単離及び塩基配列の決定
実施例 1 で得た DNA $5 \mu\text{g}$ を制限酵素 TspEI (東洋紡製) で部分分解 (2 U 使用、 65°C 、3 分間処理) した。一方、制限酵素 EcoRI (東洋紡製) で切断したラムダ ZAPII (ストラタジーン製) $0.5 \mu\text{g}$ をベクターIALアルカリフォスファターゼ (東洋紡製) により脱リン酸化処理した後、両 DNA を T4 DNA リガーゼ (東洋紡製) 1 ユニットで 16°C 、16 時間反応させて DNA を連結した。連結した DNA は GigaPack II-GOLD (ストラタジーン製) を用いてパッケージングし、エシェリヒ・コリ-XL1-BlueMRP⁺ をトランスダクション後、NZY 楽天培地 [1.0% NZAミン、0.5% 酵母エキス、0.5% NaCl、0.2% 硫酸マグネシウム 7 水和物、1.5% 寒天 (pH 7.5)] に塗布した。生じたファージプラークをアルカリ変性、中和後、ニトロセルロースフィルターにトランスファーし、このフィルターを、実施例 2 で得た PCR 産物を³²P でラベル化したプローブと、 68°C 、20 時間ハイブリダイズさせた。その後、フィルターを 65°C 、1 時間 $0.1 \times \text{SSC} + 0.1\%$ SDS で洗浄し、X 線フィルムでオートラジオグラフィを行った。その結果、約 4 Kbp の挿入 DNA を有するポジティブクローンを見いだすことができた。挿入 DNA 断片について、種々の制限酵素にてサブクローンを調製した。種々のサブクローンは常法に従い、Radioactive Sequencing Kit (東洋紡製) を用いて

10

グリセロールキナーゼ遺伝子の塩基配列を決定した。決定した塩基配列及びアミノ酸配列を配列表に示した。アミノ酸配列から求められるグリセロールキナーゼの分子量は 54805.53 であった。

【0037】実施例 5 グリセロールキナーゼをコードする遺伝子を含有する複製ベクターの作成
実施例 4 で決定されたグリセロールキナーゼの塩基配列を基にして、グリセロールキナーゼ遺伝子の両末端配列に相当する PCR 用プライマーを調製した。配列表の配列番号 5、配列表の配列番号 6 に記載される塩基配列は PCR 用プライマーを示す。実施例 1 で得た DNA 100 ng 、各プライマー 100 pmol 、dNTP 混合物 $10 \mu\text{l}$ 、反応緩衝液 $10 \mu\text{l}$ 、KOD-DNA ポリメラーゼ (東洋紡製) 2.5 U を混和し、 $100 \mu\text{l}$ とした。これを 98°C 、15 秒間の変性反応、 65°C 、2 秒間のアニーリング反応、 74°C 、30 秒間の伸長反応を 30 サイクル繰り返して PCR を行った。その結果、目的の大きさである約 1.5 Kbp のフラグメントが増幅された。この PCR 産物の塩基配列を決定し、目的のグリセロールキナーゼ遺伝子であることを確認した。この PCR 産物を、制限酵素 SmaI で消化したベクタープラスミド pUC18 (東洋紡製) と、実施例 4 と同様の条件にて連結し、組換えベクター pGYSK12 を調製した。pGYSK12 のサイズは 4.2 Kbp で、その制限酵素地図は図 1 に示す通りである。

【0038】実施例 6 形質転換体の作成
大腸菌の形質転換体の作成はエシェリヒ・コリ JM109 のコンピテントセル (東洋紡製) を pGYSK12 で形質転換し、形質転換体エシェリヒ・コリ JM109 (pGYSK12) を得た。

【0039】実施例 7 エシェリヒ・コリ JM109 (pGYSK12) からのグリセロールキナーゼの製造
エシェリヒ・コリ JM109 (pGYSK12) を LB 液体培地 [1.0% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% NaCl、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン] で 37°C 、16 時間培養し、その培養液を $8000 \times \text{g}$ 、20 分間の遠心分離によって集菌した。菌体を 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) で洗浄後、同じ緩衝液に懸濁した。ダイノミルで破砕後、 $40 \sim 80\%$ の確率で処理を行い、その上清を 40% 飽和硫酸を含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液に溶かした。この試料を 40% 飽和硫酸を含む同じ緩衝液で平衡化したトヨパール-HW65C カラム ($5 \times 15 \text{ cm}$) にかけ、 $40 \sim 0\%$ の硫酸濃度勾配によって溶出を行った。活性画分をセファデックス G-25 によるゲル過渡により脱塩し、 20 mM リン酸カリウム緩衝液で平衡化した DEAE トヨパールカラム ($5 \times 25 \text{ cm}$) にアプライン、 $0 \sim 0.5 \text{ M}$ NaCl の濃度勾配によって溶出を行うことにより分離・精製し、精製酵素液を得た。本方法により得られたグリセロールキナーゼ製品は、SDS-

PAGE的にほぼ単一なバンドを示した。

*一ゼは下記特性を有していた。

【0040】上記方法により得られたグリセロールキナ*

- (1) 作用：下記の反応を触媒した。
グリセロール + ATP \rightleftharpoons グリセロール-3-リン酸 + ADP
- (2) 作用 pH：反応 pH と相対活性との関係を図 2 に示した。
至適 pH は約 10.0 (Britton and Robinson buffer) であった。
- (3) 作用温度：反応温度と相対活性との関係を図 3 に示した。
至適温度は約 65℃ (pH 7.9) であった。
- (4) pH 安定性：pH 安定性を図 2 に示した。
約 6.5 ~ 11.0 (37℃ で 6 時間後も 90% 以上の残存活性を示す範囲) で安定であった。
- (5) 熱安定性：熱安定性を図 3 に示した。約 65℃ 以下 (pH 7.5 で 30 分間後も 90% 以上の残存活性を示す範囲) で安定であった。
- (6) 等電点：約 4.3
- (7) 分子量：約 58,000 (SDS-PAGE)
約 220,000 (ゲル濾過)
- (8) Km 値：約 0.038 mM (グリセロール)
約 0.16 mM (ATP)
約 0.36 mM (ジヒドロキシアセトン)
- (9) 比活性：50 U/mg 以上
- (10) 既知酵素との比較：本発明酵素との性質を比較し、表 1 に示す。

【0041】

※ ※ [表 1]

理化学的性質	本発明	フラボバクテリウム	好熱スフィロバクテリウム	ストリプトマイセス	セルロモナス
熱安定性 80% 以上	70℃以下、 20分間処理	70℃以下、 10分間処理	65℃以下、 30分間処理	45℃以下、 10分間処理	45℃以下 15分間処理
至適 pH	約 10.0	7.5~8	10.0	9~10	9.8 又は 7.8
至適温度	約 65℃	80℃	40℃	—	50℃
pH 安定性	約 6.5~11.0	3~11	5.0~11.0	5.5~10	5.5~10
等電点	約 4.3	4.4	—	4.5	4.2
分子量	約 58,000 (SDS-PAGE) 約 220,000 (% 濾過法)	50,000 ± 5,000 (SDS-PAGE) 145,000 ± 5,000 (% 濾過法)	58,000 (SDS-PAGE) 230,000 (% 濾過法)	65,000 (SDS-PAGE) 72,000 ± 7,200 (% 濾過法)	12,8000 % 濾過法
Km 値	約 0.038mM (グリセロール) 約 0.162mM (ATP) 約 0.362mM (ジヒドロキシアセトン)	0.039mM (グリセロール) 0.053mM (ATP)	0.048mM (グリセロール) 0.040mM (ATP)	0.048mM (グリセロール) 0.2mM (ATP) 0.066mM (ジヒドロキシアセトン)	0.027mM (グリセロール) 0.34mM (ATP)
比活性	50.8U/mg	—	114U/mg	—	36.8U/mg
参考		特開平 8-131165 号	4-9778-製品	特開昭 55-162987 号	東洋紡績 製品

【0042】

【発明の効果】本発明により、公知のグリセロールキナーゼよりも高い安定性を有する新規なグリセロールキナーゼをコードする遺伝子が単離され、遺伝子組換え技術による該酵素の製造法が確立され、グリセロールの定量への利用が可能となった。

【0043】配列番号：1

* 配列の長さ：496

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：蛋白質

起源

生物名：サーマス・フラバス

* 株名：TE3420 (DSM674)

配列

```

Met Asn Gln Tyr Met Leu Ala Ile Asp Gln Gly Thr Thr Ser Ser Arg
 1           5           10           15
Ala Ile Leu Phe Asn Gln Lys Gly Glu Ile Val His Met Ala Gln Lys
      20           25           30
Glu Phe Thr Gln Tyr Phe Pro Gln Pro Gly Trp Val Glu His Asn Ala
      35           40           45
Asn Glu Ile Trp Gly Ser Val Leu Ala Val Ile Ala Ser Val Leu Ser
      50           55           60
Glu Ala Gln Val Lys Pro Glu Gln Val Ala Gly Ile Gly Ile Thr Asn
      65           70           75           80
Gln Arg Glu Thr Thr Val Val Trp Glu Lys Asp Thr Gly Asn Pro Ile
      85           90           95
Tyr Asn Ala Ile Val Trp Gln Ser Arg Gln Thr Ala Gly Ile Cys Asp
      100          105          110
Glu Leu Lys Ala Lys Gly Tyr Asp Pro Leu Phe Arg Lys Lys Thr Gly
      115          120          125
Leu Leu Ile Asp Ala Tyr Phe Ser Gly Thr Lys Val Lys Trp Ile Leu
      130          135          140
Asp His Val Asp Gly Ala Arg Glu Arg Ala Glu Arg Gly Glu Leu Leu
      145          150          155          160
Phe Gly Thr Ile Asp Thr Trp Leu Ile Trp Lys Leu Ser Gly Gly Arg
      165          170          175
Val His Val Thr Asp Tyr Ser Asn Ala Ser Arg Thr Leu Met Phe Asn
      180          185          190
Ile His Thr Leu Glu Trp Asp Asp Glu Leu Leu Asp Ile Leu Gly Val
      195          200          205
Pro Lys Ala Met Leu Pro Glu Val Arg Pro Ser Ser Glu Val Tyr Ala
      210          215          220
Lys Thr Ala Pro Tyr His Phe Phe Gly Val Glu Val Pro Ile Ala Gly
      225          230          235          240
Ala Ala Gly Asp Gln Gln Ala Ala Leu Phe Gly Gln Ala Cys Phe Thr
      245          250          255
Glu Gly Met Ala Lys Asn Thr Tyr Gly Thr Gly Cys Phe Met Leu Met
      260          265          270
Asn Thr Gly Glu Lys Ala Val Ala Ser Lys His Gly Leu Leu Thr Thr
      275          280          285
Ile Ala Trp Gly Ile Asp Gly Lys Val Glu Tyr Ala Leu Glu Gly Ser
      290          295          300
Ile Phe Val Ala Gly Ser Ala Ile Gln Trp Leu Arg Asp Gly Leu Arg
      305          310          315          320
Met Ile Lys Thr Ala Ala Asp Ser Glu Ala Tyr Ala Glu Lys Val Glu
      325          330          335

```

15
 Ser Thr Asp Gly Val Tyr Val Val Pro Ala Phe Ile Gly Leu Gly Thr
 340 345 350
 Pro Tyr Trp Asp Ser Glu Val Arg Gly Ala Val Phe Gly Leu Thr Arg
 355 360 365
 Gly Thr Thr Lys Glu His Phe Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser Leu Ala
 370 375 380
 Tyr Gln Thr Lys Asp Val Leu Ala Val Met Glu Ala Asp Ser Gly Ile
 385 390 395 400
 Ser Leu Thr Thr Leu Arg Val Asp Gly Gly Ala Val Lys Asn Asn Phe
 405 410 415
 Leu Met Gln Phe Gln Ser Asp Leu Leu Ala Val Pro Val Glu Arg Pro
 420 425 430
 Val Val Asn Glu Thr Thr Ala Leu Gly Ala Ala Thr Leu Ala Gly Leu
 435 440 445
 Ala Val Gly Tyr Trp Asn Ser Arg Asp Ile Ala Ala Gln Trp Gln
 450 455 460
 Leu Glu Arg Arg Phe Glu Pro Lys Met Asp Asp Lys Arg Thr Met
 465 470 475 480
 Leu Tyr Asp Gly Trp Lys Lys Ala Val Arg Ala Ala Met Ala Phe Lys
 485 490 495 496

16

【0044】配列番号: 2

配列の長さ: 1488

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: ゲノムDNA

起源

生物名: サーマス・フラバス

* 株名: TE3420 (DSM674)

配列
 ATG AAT CAA TAC ATG TTA GCC ATC GAC CAA GGC ACA ACG AGC TCG CGC 48
 Met Asn Gln Tyr Met Leu Ala Ile Asp Gln Gly Thr Thr Ser Ser Arg
 1 5 10 15
 GCG ATT TTG TTC AAT CAA AAG GGC GAA ATC GTC CAT ATG GCG CAA AAA 96
 Ala Ile Leu Phe Asn Gln Lys Gly Glu Ile Val His Met Ala Gln Lys
 20 25 30
 GAG TTT ACG CAA TAT TTT CCG CAG CCC GGC TGG GTT GAG CAC AAC GCC 144
 Glu Phe Thr Gln Tyr Phe Pro Gln Pro Gly Trp Val Glu His Asn Ala
 35 40 45
 AAT GAA ATT TGG GGA TCG GTG CTT GCG GTC ATT GCG AGC GTC TTG TCC 192
 Asn Gln Ile Trp Gly Ser Val Leu Ala Val Ile Ala Ser Val Leu Ser
 50 55 60
 GAA GCG CAA GTG AAG CCG GAA CAA GTG GCA GGG ATC GGG ATT ACG AAC 240
 Glu Ala Gln Val Lys Pro Glu Gln Val Ala Gly Ile Gly Ile Thr Asn
 65 70 75 80
 CAG CGG GAG ACG ACG GTG GTG GAG AAA GAC ACC GGC AAC CCG ATT 288
 Gln Arg Glu Thr Thr Val Val Trp Glu Lys Asp Thr Gly Asn Pro Ile
 85 90 95
 TAC AAC GCC ATC GTC TGG CAG TCG CGG CAG ACG GCC GGC ATT TCG GAT 336
 Tyr Asn Ala Ile Val Trp Gln Ser Arg Gln Thr Ala Gly Ile Cys Asp
 100 105 110
 GAA CTG AAA GCG AAA GGG TAT GAC CCG CTA TTC CGC AAA AAA ACG GCC 384
 Glu Leu Lys Ala Lys Gly Tyr Asp Pro Leu Phe Arg Lys Lys Thr Gly
 115 120 125
 TTG CTT ATT GAC GCC TAT TTT TCC GGG ACA AAA GTG AAA TGG ATT TTG 432

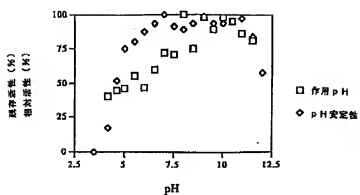
17	18
Leu Leu Ile Asp Ala Tyr Phe Ser Gly Thr Lys Val Lys Trp Ile Leu	
130	135 140
GAT CAT GTC GAC GGA GCG CGC GAA CGG GCG GAG CGC GGC GAA TTG CTT	480
Asp His Val Asp Gly Ala Arg Glu Arg Ala Glu Arg Gly Glu Leu Leu	
145	150 155 160
TTC GGC ACG ATC GAT ACG TGG CTC ATT TGG AAG CTG TCT GGC GGC CGC	528
Phe Gly Thr Ile Asp Thr Trp Leu Ile Trp Lys Leu Ser Gly Gly Arg	
165	170 175
GTC CAT GTA ACC GAT TAC TCG AAC GCG TCG CGC ACA TTA ATG TTT AAC	576
Val His Val Thr Asp Tyr Ser Asn Ala Ser Arg Thr Leu Met Phe Asn	
180	185 190
ATT CAT ACG CTC GAG TGG GAT GAC GAG CTG CTT GAT ATC CTA GGC GTA	624
Ile His Thr Leu Glu Trp Asp Asp Glu Leu Asp Ile Leu Gly Val	
195	200 205
CGG AAG GCG ATG CTT CCT GAG GTT CGG CCG TCG TCG GAA GTG TAC GCG	672
Pro Lys Ala Met Leu Pro Glu Val Arg Pro Ser Ser Glu Val Tyr Ala	
210	215 220
AAA ACC GCC CCT TAT CAC TTC TTT GGC GTC GAG GTG CCG ATC GCG GGA	720
Lys Thr Ala Pro Tyr His Phe Phe Gly Val Glu Val Pro Ile Ala Gly	
225	230 235 240
CCC GCA GGC GAC CAG CAG GCG GCC TTG TTC GGG CAG GCG TGC TTT ACG	768
Ala Ala Gly Asp Gln Gln Ala Ala Leu Phe Gly Gln Ala Cys Phe Thr	
245	250 255
GAA GGG ATG GCG AAA AAT ACG TAC GCG ACC GCG TGC TTT ATG CTC ATG	816
Glu Gly Met Ala Lys Asn Thr Tyr Gly Thr Gly Cys Phe Met Leu Met	
260	265 270
AAC ACC GGG GAA AAG GCG GTC GCG TCA AAA CAG GCG CTG CTC ACG ACG	864
Asn Thr Gly Glu Lys Ala Val Ala Ser Lys His Gly Leu Leu Thr Thr	
275	280 285
ATC GCT TGG GGA ATA GAC GCG AAG GTC GAA TAC GCC CTT GAA GGC AGC	912
Ile Ala Trp Gly Ile Asp Gly Lys Val Glu Tyr Ala Leu Glu Gly Ser	
290	295 300
ATC TTC GTC GCC GGT TCG GCC ATT CAA TGG CTG CGC GAC GGC TTG CCG	960
Ile Phe Val Ala Gly Ser Ala Ile Gln Trp Leu Arg Asp Gly Leu Arg	
305	310 315 320
ATG ATC AAA ACG GCG GCG GAC AGC GAA GCG TAT GCC GAA AAA GTC GAG	1008
Met Ile Lys Thr Ala Ala Asp Ser Glu Ala Tyr Ala Glu Lys Val Glu	
325	330 335
TCG ACC GAC GGG GTG TAT GTC GTA CCG GCG TTC ATC GGG CTT GGC ACG	1056
Ser Thr Asp Gly Val Tyr Val Val Pro Ala Phe Ile Gly Leu Gly Thr	
340	345 350
CCG TAT TGG GAC AGC GAG GTC CGC GGG GCG GTG TTT GGC CTC ACG CGC	1104
Pro Tyr Trp Asp Ser Glu Val Arg Gly Ala Val Phe Gly Leu Thr Arg	
355	360 365
GGC ACA ACG AAA GAG CAT TTC ATC CCG GGC ACC TTG GAA TCG CTT GCT	1152
Gly Thr Thr Lys Glu His Phe Ile Arg Ala Thr Thr Glu Ser Leu Ala	
370	375 380
TAC CAG ACA AAA GAT GTG CTC GCG GTC ATG GAA GCC GAT TCC GGC ATC	1200
Tyr Gln Thr Lys Asp Val Leu Ala Val Met Glu Ala Asp Ser Gly Ile	
385	390 395 400

19	TCG CTG ACC ACG TTG CGC GTT GAC GGC GGG GGG GGG AAA AAC AAT TTC	1248
	Ser Leu Thr Thr Leu Arg Val Asp Gly Gly Ala Val Lys Asn Asn Phe	
	405 410 415	
	CTT ATG CAA TTC CAG AGC GAT TTG CTT GCC GTT CCG GTC GAA CGT CCG	1296
	Leu Met Gln Phe Gln Ser Asp Leu Leu Ala Val Pro Val Glu Arg Pro	
	420 425 430	
	GTT GTG AAT GAA ACG AGC GCC TTG GGT GCG GCG TAT TTG GCC GGG CTG	1344
	Val Val Asn Glu Thr Thr Ala Leu Gly Ala Ala Tyr Leu Ala Gly Leu	
	435 440 445	
	GCG GTC GGC TAC TGG AAC AGC CGA GAT GAC ATC GCC GCC CAA TGG CAA	1392
	Ala Val Gly Tyr Trp Asn Ser Arg Asp Asp Ile Ala Ala Gln Trp Gln	
	450 455 460	
	CTC GAG CGC CGG TTT GAG CCG AAG ATG GAT GAC GAC AAG CGA ACG ATG	1440
	Leu Glu Arg Arg Phe Glu Pro Lys Met Asp Asp Asp Lys Arg Thr Met	
	465 470 475 480	
	CTC TAC GAT GGC TGG AAA AAA GCG GTG CCG GCG GCG ATG GCG TTT AAA	1488
	Leu Tyr Asp Gly Trp Lys Lys Ala Val Arg Ala Ala Met Ala Phe Lys	
	485 490 495 496	
【0045】配列番号: 3	配列の長さ: 3 3	
配列の長さ: 2 1	20 配列の型: 核酸	
配列の型: 核酸	鎖の数: 一本鎖	
鎖の数: 一本鎖	配列の種類: 合成DNA	
配列の種類: 合成DNA	トポロジー: 直鎖状	
トポロジー: 直鎖状	配列	
配列の特徴	GGGGGAAGAA GGTTATGAAT CAATACATGT TAG	33
特徴を表す記号: modified base	【0048】配列番号: 6	
存在位置: 6, 9, 12, 15, 18	配列の長さ: 2 9	
他の情報: N=1	配列の型: 核酸	
配列	鎖の数: 一本鎖	
TTTGCNACNG TNGANACNTG G	30 配列の種類: 合成DNA	
【0046】配列番号: 4	トポロジー: 直鎖状	
配列の長さ: 2 0	配列	
配列の型: 核酸	TTATTAAAC GGCATCGCG CCGCACCG	29
鎖の数: 一本鎖	【図面の簡単な説明】	
配列の種類: 合成DNA	【図1】組換えベクター-p GYK 12の制限酵素地図を示す。	
トポロジー: 直鎖状	【図2】本発明のグリセロールキナーゼの種々のpHにおける相対性(作用pH)および残存活性(安定pH)を示す図である。	
配列の特徴	40 【図3】本発明のグリセロールキナーゼの種々の温度における相対活性(作用温度)および残存活性(30分間、pH 7.5、熱安定性)を示す図である。	
特徴を表す記号: modified base		
存在位置: 3, 6, 9, 12, 15		
他の情報: N=1		
配列		
TGNATNCCNT GNCNACGAA	20	
【0047】配列番号: 5		

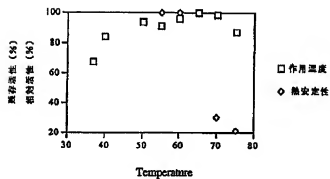
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁴

識別記号

F I

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/12

C 1 2 R 1:19)